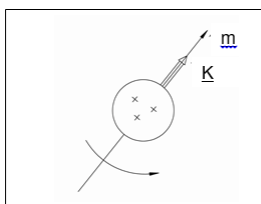


spettroscopia EPR

1

Bruker BioSpin

EPR (Electron Paramagnetic Resonance)
ESR (Electron Spin Resonance)



$$\underline{m} = \gamma \underline{K}$$

K = momento angolare
 m = momento magnetico

$$\gamma_{^1H} = 42.6 \frac{MHz}{Tesla}$$

$$\gamma_{e^-} = -176 \frac{GHz}{Tesla}$$

$$\gamma = \left(\frac{e}{m} \right) \left(\frac{g}{2} \right) \frac{MHz}{tesla}$$

Rapporto giromagnetico

g = fattore g , per elettrone isolato $g = 2.00232$

In presenza di interazioni $1.4 < g < 9.7$

2

Bruker BioSpin

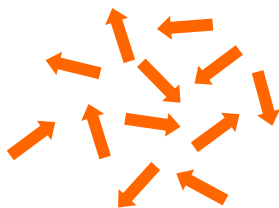
- La RMN misura atomi/molecole con un numero dispari di protoni o neutroni
- l'EPR misura atomi/molecole con un numero dispari di elettroni: *elettroni spaiati* (materiali paramagnetici).

Esempi comuni sono:

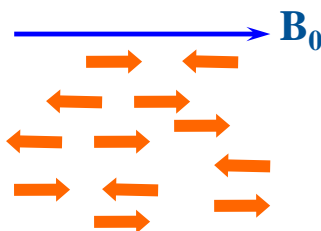
- Ioni di metalli di transizione: Fe, Cu, Mn, Co, Mo, Ni...
- Radicali Liberi: Tipicamente campioni contenenti carbonio, azoto o ossigeno.
- Radicali stabili: Denti o unghie esposti ai raggi x, tumori come il melanoma della pelle
- Reperti archeologici

come funziona l'EPR?

Gli elettroni hanno uno "spin" e, quando sono disaccoppiati, lo spin fornisce un momento magnetico misurabile.



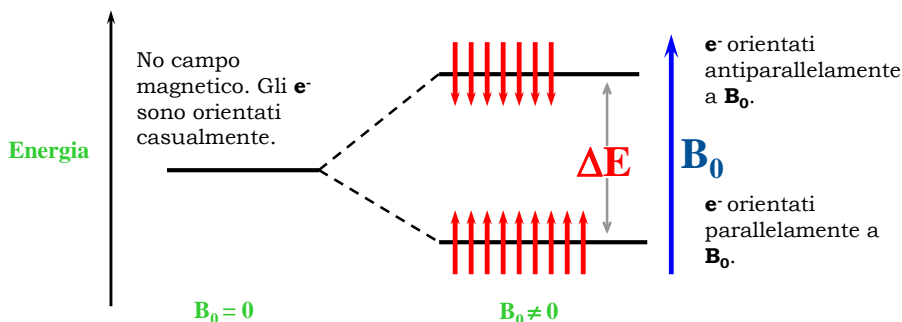
In assenza di campo magnetico esterno, il momento magnetico degli elettroni si orienta casualmente.



Quando si applica un campo magnetico esterno, gli elettroni si allineano parallelamente o antiparallelamente a tale campo.

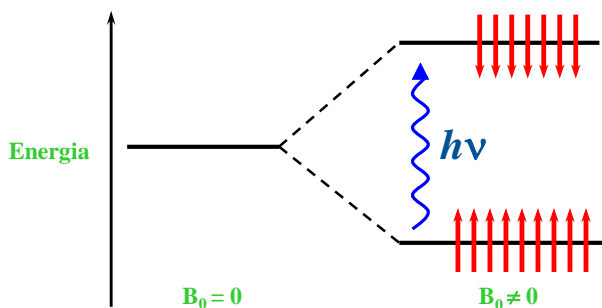
L'orientamento degli elettroni disaccoppiati in un campo magnetico è conosciuto come **effetto Zeeman**.

L'interazione Zeeman produce due livelli di energia discreti a seconda che lo spin sia parallelo o antiparallelo a \mathbf{B}_0 .



5

Bruker BioSpin



$$\Delta E = hf_0, 2\pi f_0 = \gamma B_0$$

$$\Delta E = hf_0 = (h \gamma B_0) / (2 \pi) = (h e g B_0) / (4 \pi \mu) = g \mu_B B_0$$

con μ_B magnetone di Bohr

L' MRI misura l'emissione, l'EPR l'assorbimento

La radiazione a Microonde è utilizzata per spostare gli elettroni dallo stato più popolato a quello meno popolato.

(cioè da quello parallelo all'antiparallelo).

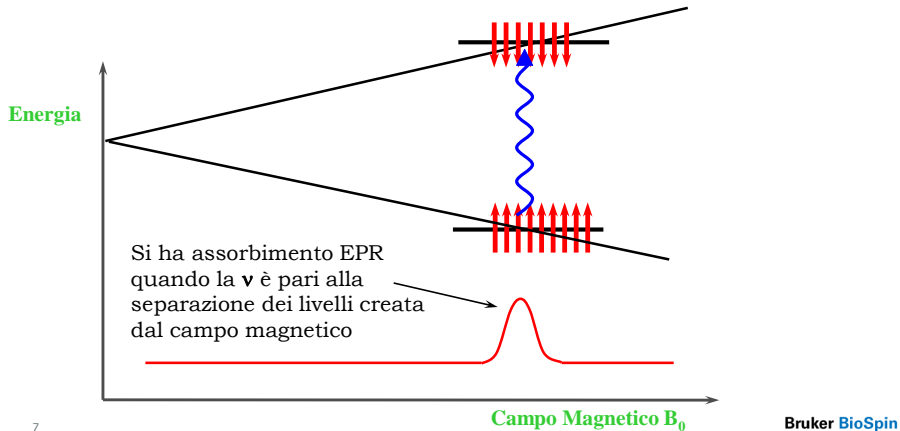
6

Bruker BioSpin

Per ottenere uno spettro EPR si può:



- lasciare B_0 fisso e applicare uno sweep in frequenza, come nella spettroscopia convenzionale.
- fissare f_0 e variare il campo B_0 . A causa delle limitazioni dell'elettronica a microonde, questa seconda alternativa offre prestazioni superiori.



Le bande EPR



Dalla misura del picco B_0 si risale a $g = hf_0 / \mu_B B_0$

\Rightarrow alti valori di g danno righe a campi più bassi!

Campi di risonanza e λ per $g = 2$ alle frequenze a μW comunemente usate in EPR.

Banda μW	Frequenza (GHz)	B_0 (Gauss)	λ (mm)
L	1.1	392	330
S	3.0	1070	100
X	9.5	3389	32
K	24.0	8560	12.5
Q	35.0	12485	8.6
W	94.0	33600	3.2

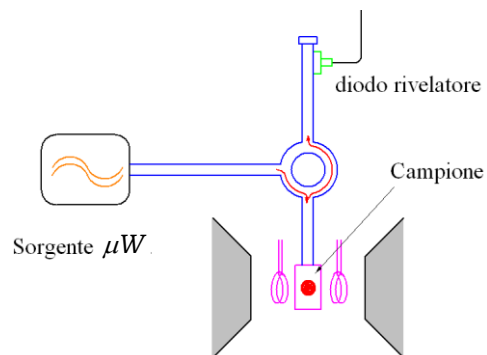
Lo spettrometro EPR

9

Bruker BioSpin

riflessione

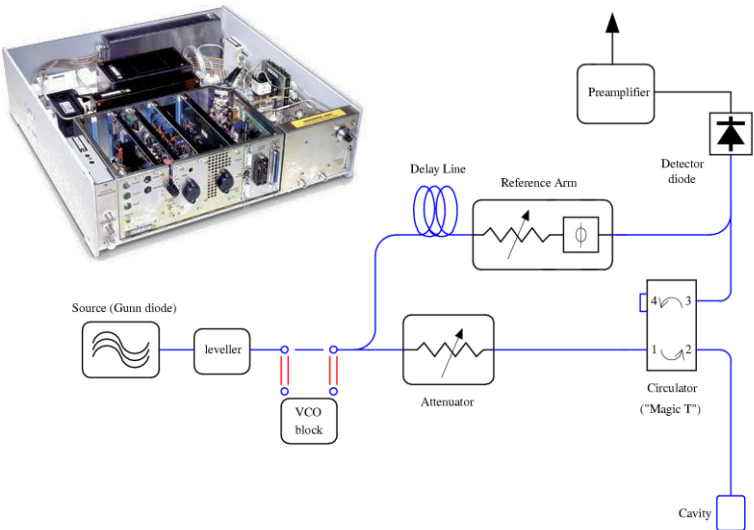
*Elementi essenziali
spettrometro EPR di
riflessione*



10

Bruker BioSpin

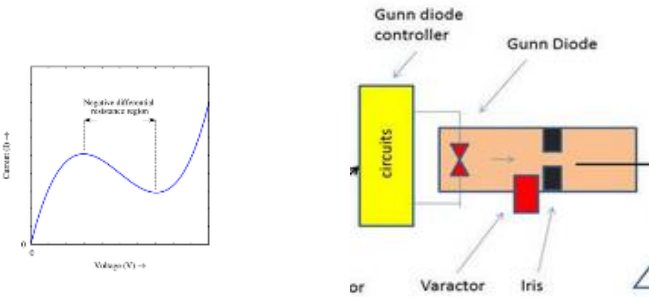
Schema ponte EPR



11

Bruker BioSpin

la sorgente di microonde: il diodo Gunn



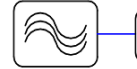
12

Bruker BioSpin

la sorgente: il diodo Gunn

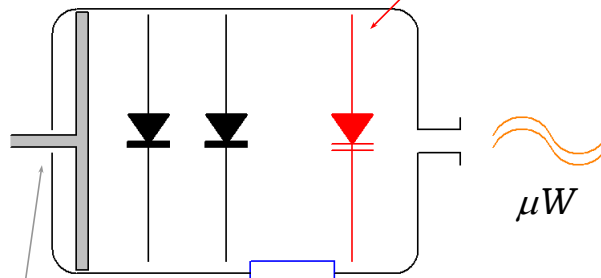


Source (Gunn diode)



diodi Gunn (ce ne sono 2)

diodo Varactor: Cambia la capacità in funzione della V applicata. (sintonia fine)



Piezo (sintonia iperfine)

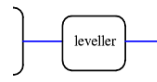
Tuning Meccanico: per accordare la frequenza del Gunn a quella della cavità (sintonia grossolana)

13

Bruker BioSpin

il Leveller

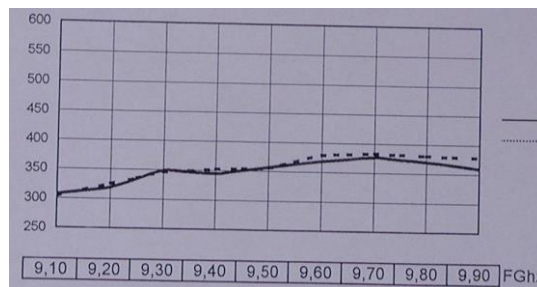
iodo)



Le μW fuoriescono dal Gunn con una potenza che varia da circa 300 a 400 mW, con una leggera dipendenza dalla frequenza.

Il **leveller** è un *attenuatore* che livella la potenza in uscita a circa **200 mW**.

potenza
(mW)

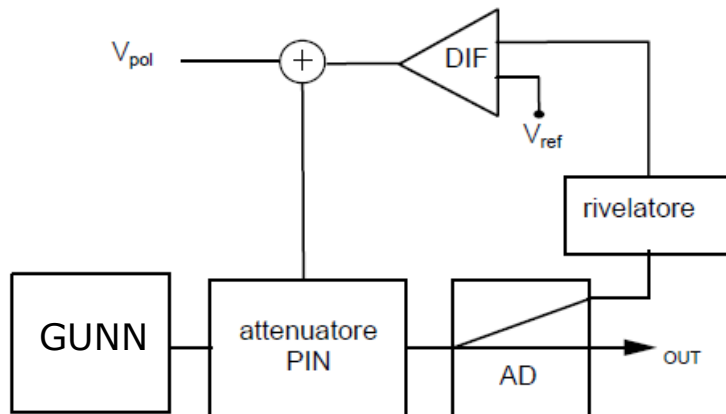


frequenza
(GHz)

Bruker BioSpin

14

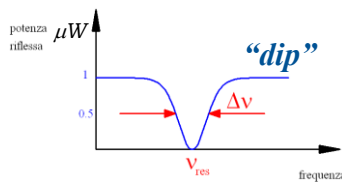
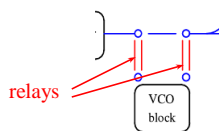
Schema di leveller



15

Bruker BioSpin

Tuning Mode: VCO (Voltage Controlled Oscillator)



Per poter sintonizzare l'iride di adattamento tra guida e risonatore (in gergo tecnico si dice visualizzare il **dip**) bisogna poter fare uno sweep delle μW ampio e veloce. Non si può usare il Gunn \Rightarrow si aggiunge un'altra sorgente contenuta nel **VCO block**.

Il VCO può fare uno sweep veloce di ampiezza pari a circa 80 MHz, ma ha 2 "difetti":

- **bassa potenza ($< 50 \text{ mW}$)**
- **alta rumorosità**

16

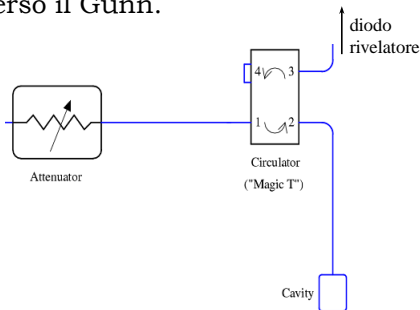
Bruker BioSpin

Attenuatore e Circolatore



Le μW passano per un **attenuatore** variabile ($0 \div 60$ dB), e quindi raggiungono la cavità passando attraverso il **circolatore** ("magic T"). Il segnale viene attenuato per evitare effetti non lineari sul campione.

Le μW riflesse dalla cavità vanno quindi al diodo rivelatore, senza ritornare verso il Gunn.



17

Bruker BioSpin

La cavità EPR



La cavità EPR è di forma *rettangolare* o *cilindrica* e risuona ad una data frequenza a μW .

Vengono usate per incrementare il B_1 delle μW (Tale campo, nelle guide d'onda, è dell'ordine di 10^{-3} Gauss, in cavità è di qualche Gauss) ma anche per avere una regione con un forte campo magnetico e basso campo elettrico.

Campi B ed E separati \Rightarrow si evita l'assorbimento (non risonante) di μW via campo elettrico (\Rightarrow degradazione di Q a causa dell'energia dissipata e riscaldamento campione).

E' il campo B che comporta assorbimento EPR.

Una cavità è caratterizzata dal **fattore di merito** Q che ne indica l'efficienza. All'aumentare di Q , aumenta B_1 e quindi l'efficienza dello spettrometro.

18

Bruker BioSpin

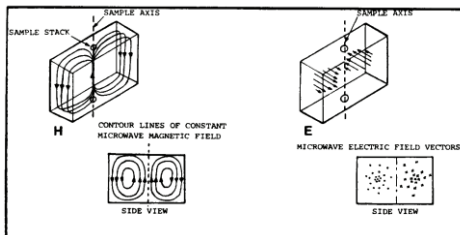
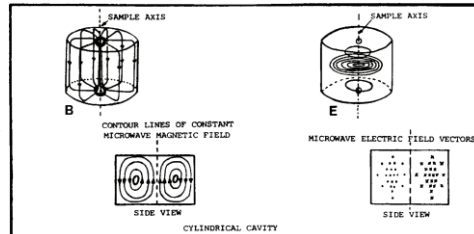
Modi delle cavità



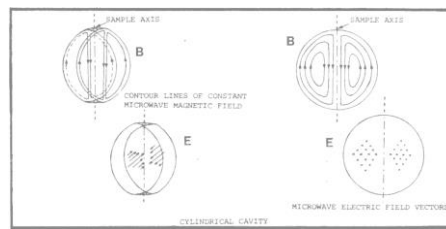
TE_{011}

I modi delle cavità sono indicati dalle sigle TE_{abc} e TM_{abc} .

E ed M indicano i campi \mathbf{E} e \mathbf{B} e a , b e c il numero di mezze λ nelle direzioni x , y e z .



TE_{102}



TM_{110}

Bruker BioSpin

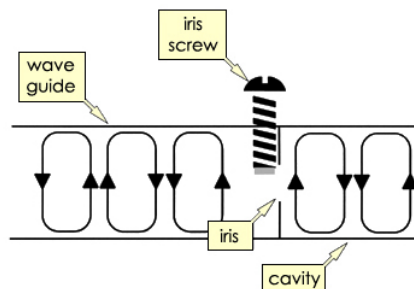
19

Accoppiamento o "matching"



L'accoppiamento tra le μW e la cavità è effettuato per mezzo dell'*iride* (iris).

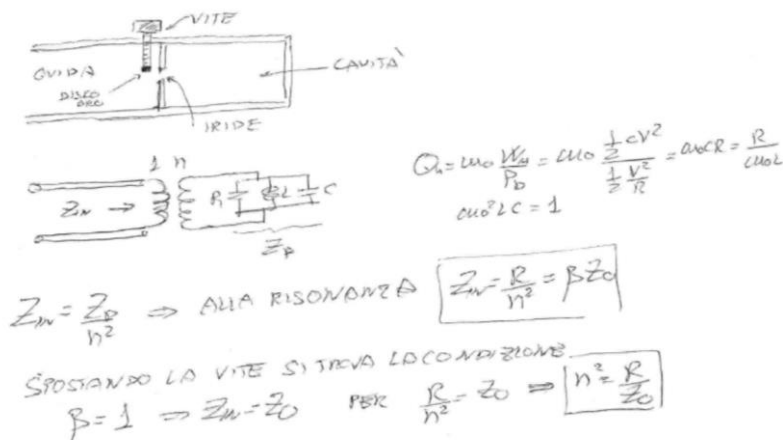
L'iride varia l'impedenza della cavità \Rightarrow varia il "*matching*" (adattamento di impedenza).



Bruker BioSpin

20

Modello Accoppiamento



21

Bruker BioSpin

Accoppiamento critico della cavità

Il sistema è pronto per la misura quando la cavità ha raggiunto **l'accoppiamento critico**.

All'accoppiamento critico, tutta l'energia alla cavità è assorbita dalla stessa, ovvero **le μW riflesse sono nulle**.

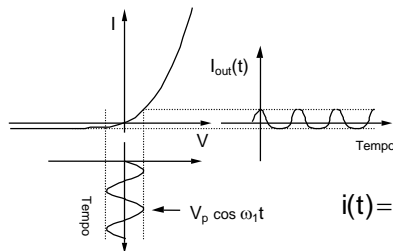
Quando il campo B_0 raggiunge le condizioni di risonanza, il campione assorbe l'energia delle $\mu W \Rightarrow Q$ della cavità diminuisce ovvero il campione, assorbendo, cambia l'impedenza della cavità.

La cavità non è più perfettamente accoppiata e una parte delle μW è riflessa al ponte, generando il segnale EPR.

22

Bruker BioSpin

Il detector Diode



$$I(V) = I_s (e^{\alpha V} - 1)$$

$$i(t) = \frac{v(t)}{R_J} + \frac{\alpha v(t)^2}{2R_J} = G_J v(t) + G_J \frac{\alpha}{2} v(t)^2$$

$$v(t) = \hat{V} \sin(\omega t)$$

$$i(t) = \frac{\hat{V} \sin \omega t}{R_J} + \frac{\alpha \hat{V}^2 \sin^2 \omega t}{2R_J} = \frac{\hat{V} \sin \omega t}{R_J} + \frac{\alpha \hat{V}^2}{4R_J} - \frac{\alpha \hat{V}^2 \cos 2\omega t}{4R_J}$$

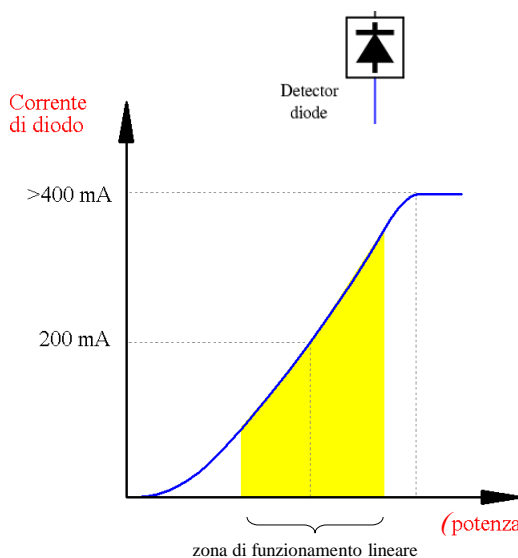
Quindi, applicando in ingresso al rivelatore un segnale armonico, si ottiene in uscita una corrente continua proporzionale al quadrato dell'ampiezza del segnale applicato.

Quindi proporzionale alla potenza del segnale applicato.

23

Bruker BioSpin

Il detector Diode



Le μW riflesse sono misurate da un **diodo rivelatore** (Schottky barrier diode).

Tale diodo **NON** ha un comportamento lineare a potenza di $\mu W^{1/2}$ prossima a zero.

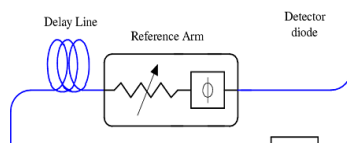


bisogna sommare alle μW riflesse delle μW di polarizzazione, dette di "**bias**".

24

Bruker BioSpin

Reference Arm



Una piccola parte delle μW prodotte viene deviata nel “**reference arm**” passando per un secondo attenuatore per permettere al diodo ricevente di lavorare attorno a 200 mA.

C'è inoltre uno sfasatore. Le μW riflesse dalla cavità e quelle del *reference arm* devono essere in fase.

25

Bruker BioSpin

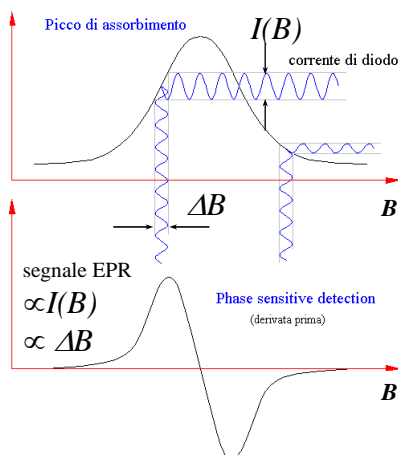
La PSD: Phase Sensitive Detection



In EPR viene aggiunto a B un campo magnetico alternato, di solito a 100 KHz \rightarrow la “modulazione” di campo

Funzionamento analogo alla *radio AM*, in cui il segnale audio è modulato da una “portante”

La corrente di diodo risultante è modulata alla stessa ν e l'intensità è proporzionale alla derivata del picco di assorbimento EPR.



26

Bruker BioSpin

Vantaggi della PSD

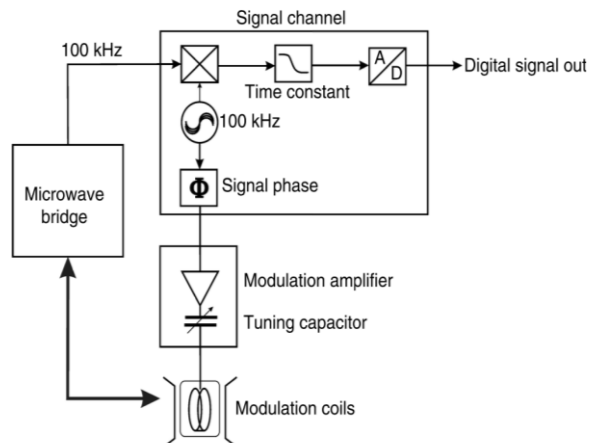


- *Incremento del rapporto segnale/rumore* (La corrente di diodo a 100 KHz passa attraverso un filtro passa-banda e le componenti di rumore coerenti a frequenze diverse sono eliminate).
- Il segnale può essere integrato eliminando il rumore casuale.
- La prima derivata mostra meglio piccoli cambi della pendenza \Rightarrow interpretazione migliore di spettri poco risolti.
- elimina le instabilità della linea di base (dovute a drift dell'elettronica DC).

27

Bruker BioSpin

Schema a blocchi della PSD



Si genera un segnale a 100 kHz del quale è controllata la fase. Il segnale viene amplificato ed inviato alle bobine di modulazione. Una capacità di tuning serve per portare a risonanza l'induttanza delle bobine e far vedere al generatore un'impedenza reale.

28

Bruker BioSpin

La PSD: funzionamento



La corrente di diodo S_o (a 100 KHz = segnale EPR AC), è *moltiplicata* con un segnale di riferimento S_i nel “modulatore” ottenendo il segnale U .

Ad U viene applicato un filtro passa basso e ne resta la componente continua $I(B)$. Tale procedura è detta anche **lock-in**.

$$S_i = a \cdot \cos(\omega t)$$

$$S_o = I(B) \cdot \cos(\omega t + \phi)$$

$$U = \frac{a \cdot I(B)}{2} (\cos(2\omega t + \phi) + \cos(\phi))$$

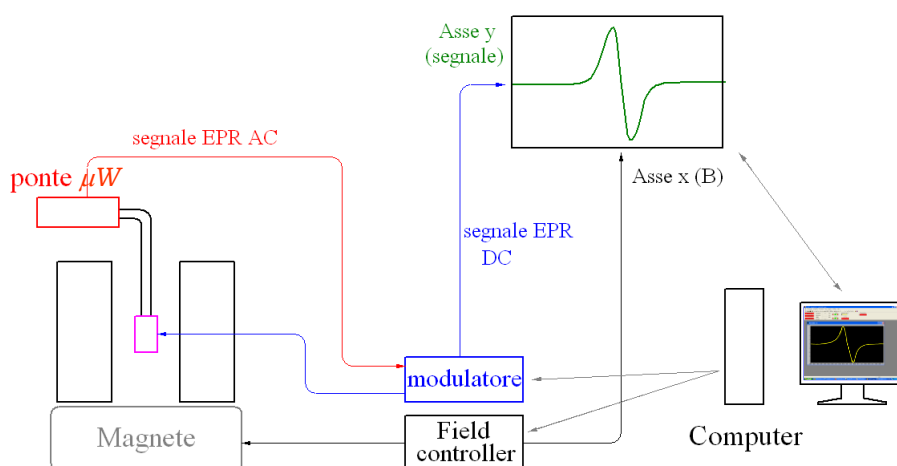
$$U_f = \frac{a \cdot I(B)}{2} \cos(\phi) \propto I(B) \quad (*)$$

(*) ϕ è fissata con la calibrazione del S.C. in modo da massimizzare il segnale

29

Bruker BioSpin

Schema a blocchi spettrometro EPR



30

Bruker BioSpin

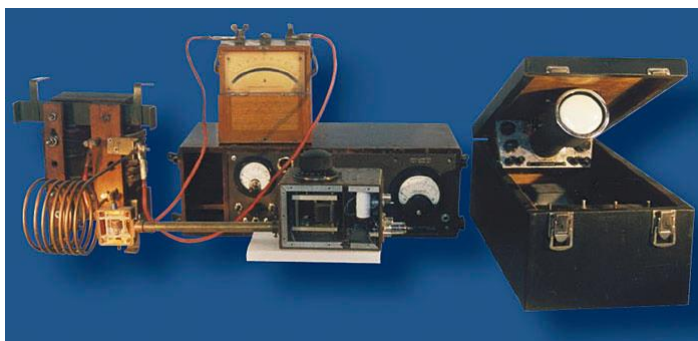
SEMINARIO

EPR

31

Bruker BioSpin

EPR... *vintage*



Il primo spettrometro EPR, Zavojsky 1942

32

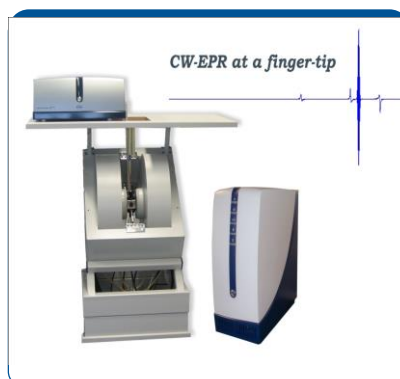
Bruker BioSpin

EPR... *Tempi moderni*



EMX ||| plus

EMX ||| micro



33

Bruker BioSpin

Presentatoto un mese fa



EMX nano



34

Bruker BioSpin

Elexsys - The High-End Platform



35

Bruker BioSpin

Industrial EPR - Table-Top Analyzer



Food Irradiation control
(three European Standard Methods)



Beer EPR
Lagtime



Dosimetry
with
Alanine/EPR Method



Drug Delivery
Free Radical Monitoring

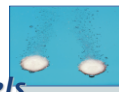
Pharmacokinetics
Antiradical Activity

Antioxidants

ROS

Spin-Labels

Spin-Traps



36

Bruker BioSpin

esempi di cavità EPR



Le più usate

Super High Sensitivity Resonator



cilindrica

The universal X-Band Resonator



rettangolare

37

Bruker BioSpin

esempi di cavità EPR



cilindriche

High T cavity: CW-EPR from 400 K to 1200 K



The X-Band CW-ENDOR Cavity



Cylindrical Mode Resonator: aqueous and High-dielectric Samples



38

Bruker BioSpin

...esempi di cavità EPR rettangolari



Mixing Cell Resonator:
a combination of continuous
flow and dielectric X-Band cavity



Dielectric Resonator:
dedicated to Spin Labels



Dual Mode Resonator:
separate allowed and
forbidden transitions



Double Rectangular X-Band Resonator:
Quantitative EPR and precise g-factor
measurements



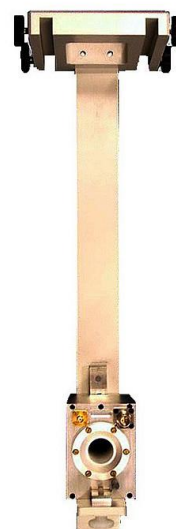
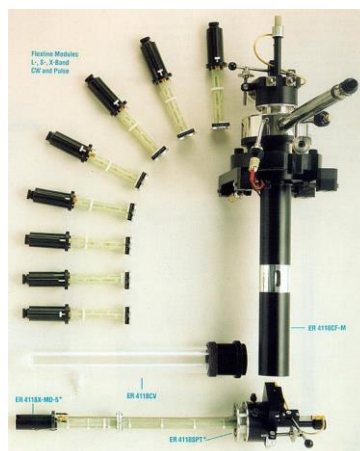
39

Bruker BioSpin

...esempi di risonatori EPR flex-line ed EPR *in-vivo*



In vivo spectroscopy



40

Bruker BioSpin

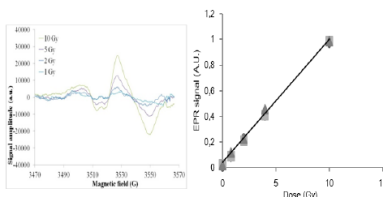
Dove nasce l'idea di XBANDE

Dosimetria per situazioni di emergenza

La radiazione ionizzante induce radicali nel vetro e nelle unghie



I segnali EPR sono adatti a essere usati come indicatori dell'avvenuta esposizione di un individuo in caso di incidente



The **EPR signal is proportional to:**

$$\Pi = \frac{1}{2} \eta_h Q_U$$

Magnetic filling factor

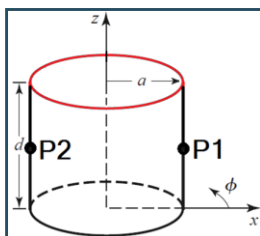
$$\eta_h = \frac{\int_{sample} H_1^2 dV}{\int_{cavity} H_1^2 dV + \int_{airbox} H_1^2 dV}$$

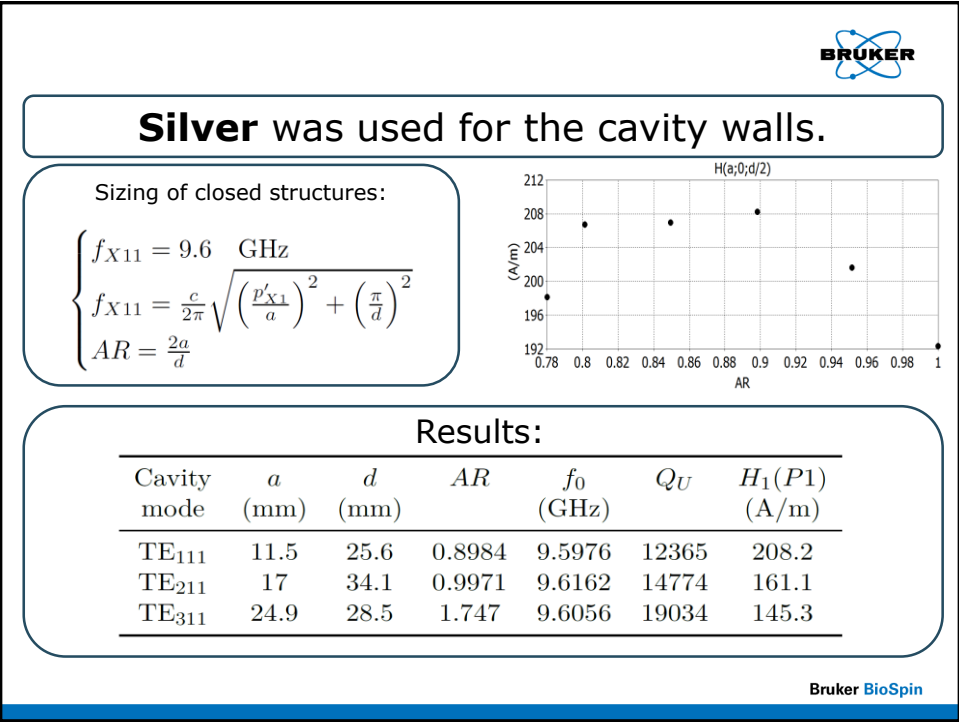
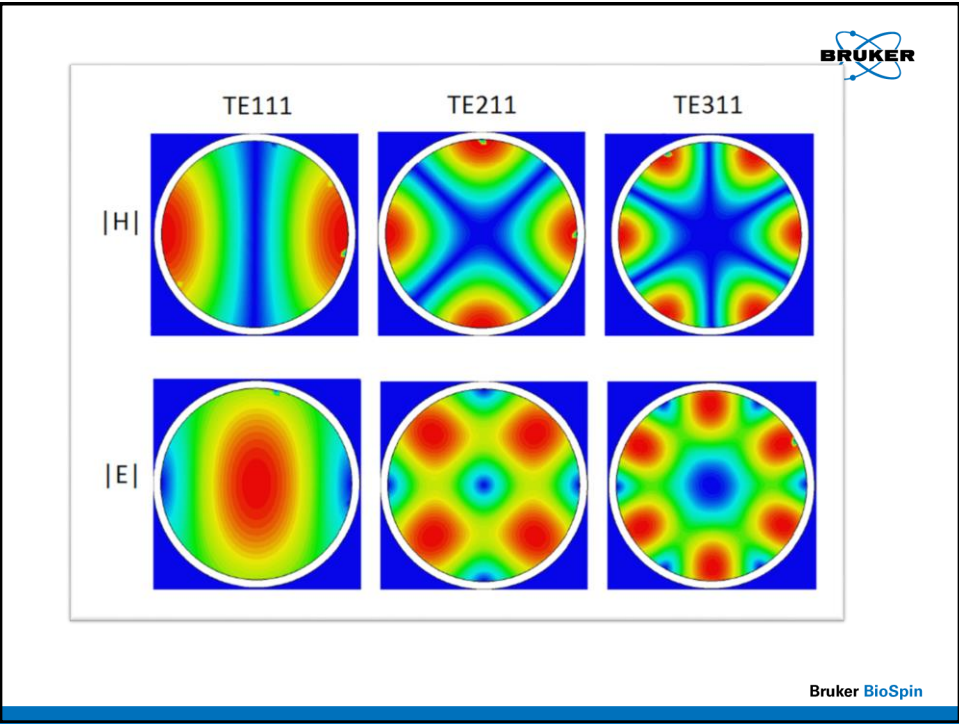
Electric filling factor

$$\eta_e = \frac{\int_{sample} E_1^2 dV}{\int_{cavity} E_1^2 dV + \int_{airbox} E_1^2 dV}$$

- **High unloaded Q**
- One region, along the side walls, where:
 - The magnetic field is maximum
 - The electric field is minimum
 - The surface current lines are rectilinear
- Surface current in the region in which the resonator will be capped is as low as possible
- No presence of resonant modes in the neighborhood of the working frequency

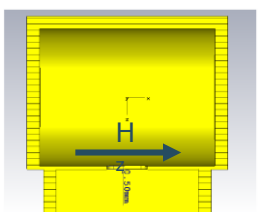
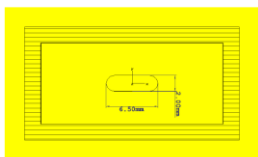
The TE_{x11} ($X=1,2,3$) modes of a cylindrical cavity were turned out to be the best choice possible.



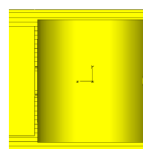
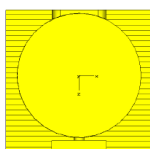
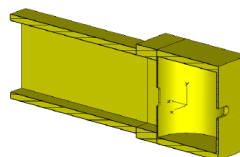
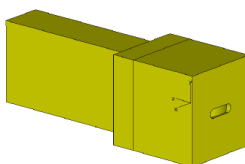


Starting from the closed structures, **two apertures** were designed:

The **iris**:

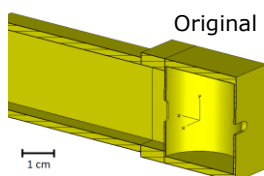


The **non-radiating** slot:



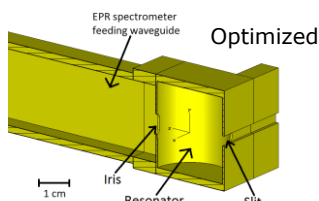
Bruker BioSpin

Helmholtz coils were designed and the **modulation field homogeneity** was investigated.



Original

1 cm



Optimized

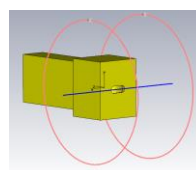
EPR spectrometer feeding waveguide

Iris

Resonator

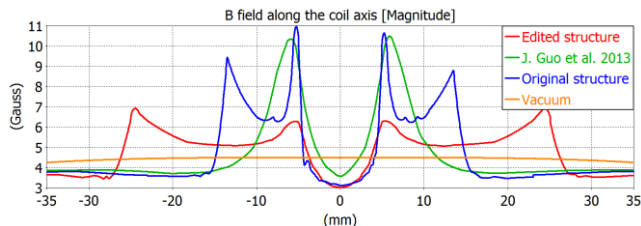
Slit

1 cm



The structures were optimized.

Higher homogeneity was obtained.



Bruker BioSpin

Design limitations:

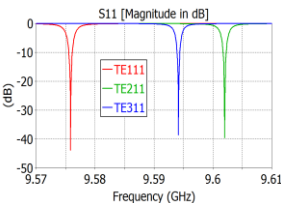
- $Q_U > 10\,000$
- $w_{\text{slit}} < 4\text{ mm}$

Dimensions of the final cavities:

Resonant mode	a (mm)	d (mm)	h_slit (mm)	w_slit (mm)	h_iris (mm)	w_iris (mm)
TE ₁₁₁	11.5	25.6	10	3	5.9	2
TE ₂₁₁	17.0	34.1	10	3.5	6.4	2
TE ₃₁₁	24.9	28.5	8	4	6.8	2

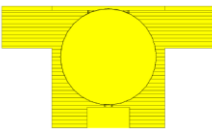
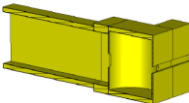
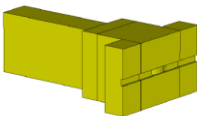
Sensitivity of the final

Resonant mode	f_0 (GHz)	Q_U	$\eta_h \cdot 10^{-4}$	$\eta_e \cdot 10^{-5}$	η_h/η_e	Π
TE ₁₁₁	9.58	10781	2.19	0.74	29.4	1.18
TE ₂₁₁	9.60	12188	1.64	0.86	19.0	1.00
TE ₃₁₁	9.59	13413	1.66	1.05	14.7	1.11

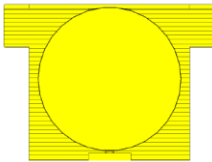
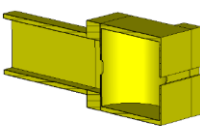
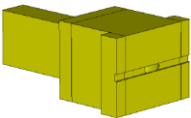


All the three simulated cavities have an unloaded **quality factor higher than 10000**, a **comparable sensitivity** and a **return loss** of about **-40 dB**.

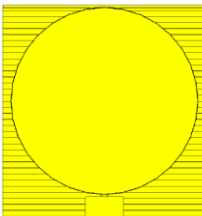
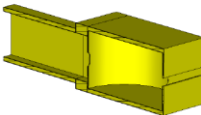
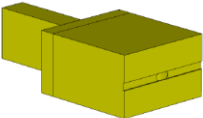
TE₁₁₁



TE₂₁₁

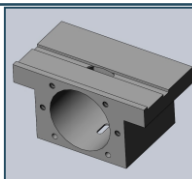
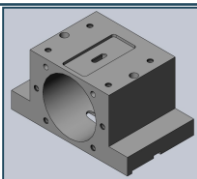


TE₃₁₁

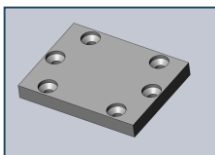


The structure was divided in **three different parts**:

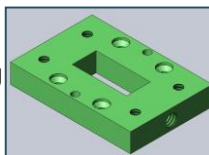
The
resonator



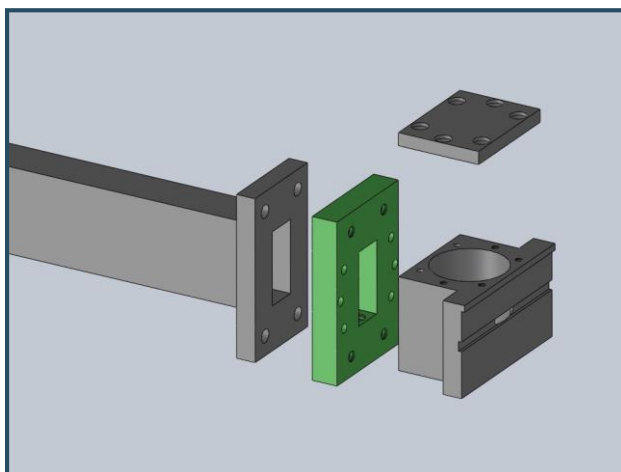
The
lid



The
coupling unit

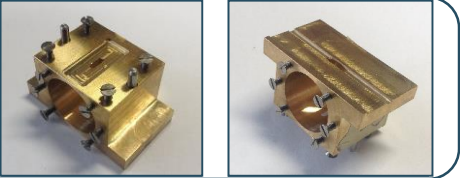


The cavity was manufactured in the mechanical workshop of the ISS, by mechanical specialists, using **pure brass** (instead of silver).

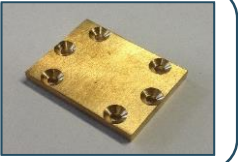


The structure was divided in **three different parts**:

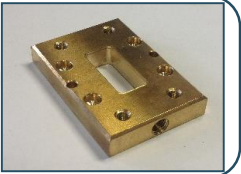
The resonator



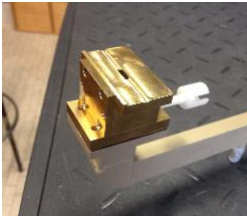
The lid



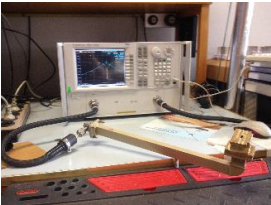
The coupling unit



The cavity was **manufactured** in the mechanical workshop of the ISS, by mechanical specialists, using **pure brass** (instead of silver).



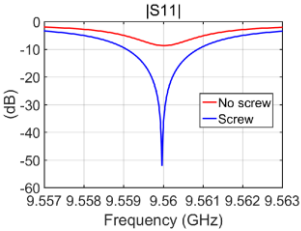
The cavity was tested using an **Agilent E8363C Precision Network Analyzer (PNA)**



In order to estimate the losses introduced by the waveguide, a **fitting routine** was used.

Results obtained:

Data from	Tuning screw	f_0 (GHz)	Q_U	α	β
Simulation	No	9.575	5822	-	0.533
PNA	No	9.560	4266	-	0.46
Fit	No	9.560	4193	0.88	0.409
PNA	Yes	9.560	4146	-	1.00
Fit	Yes	9.560	4325	0.83	0.993



Campo magnetico esterno

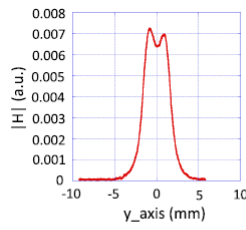
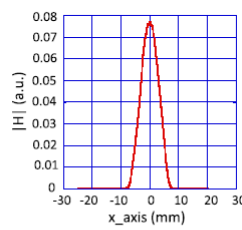
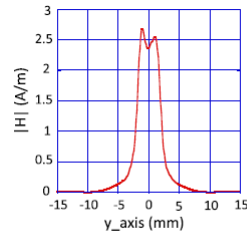
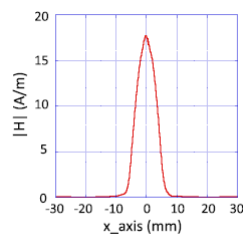
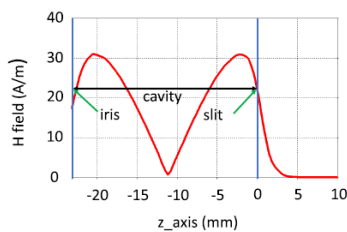
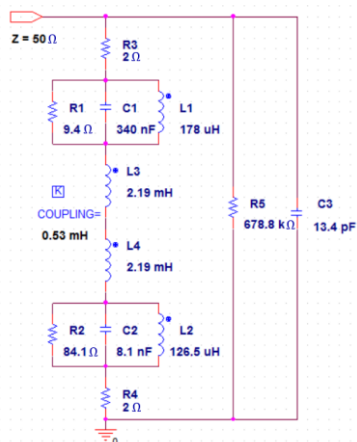
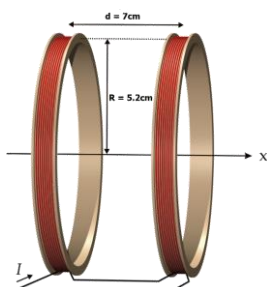


Fig. 10. (a) Simulated magnitude of the magnetic field along a line parallel to the slit (x -axis) and (b) orthogonal to the slit (y -axis). (c) and (d) Same distributions measured with the perturbation method.

55

Bruker BioSpin

Coil model



56

Bruker BioSpin

Measurements

The efficacy of the whole system was tested by using, as sample material, a powder of stable free-radical molecules (DPPH), positioned on an adhesive support in contact with the slit. The figure shows the signal recorded by the Bruker spectrometer equipped with the realised open resonator.

